

BULLETIN

DU

DÉPARTEMENT DE L'AGRICULTURE

AUX

INDES NÉERLANDAISES.

N^o. IX.

(MICRO-BIOLOGIE III)

BUITENZORG

IMPRIMERIE DU DÉPARTEMENT

1907.

EXPLICATION DES PLANCHES.

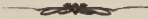


PLANCHE 1.

Fig. 1.

Plaque de gélose-trioléine-chlorure d'ammonium. Culture de *B. fluor.* liquef. âgée de 3 jours. Grossissement 180.

Fig. 2.

Culture de *B. fluor.* liquef. sur gélose-acide oléique-nitrate de potassium, âgée de 3 jours. Grossissement 180.

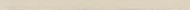
PLANCHE 2.

Fig. 3.

Culture sur une plaque de gélose-trioléine-nitrate de potassium. Grossissement 250.

Fig. 4.

Gouttelette d'acide oléique de la figure 2, grossie 400 fois.





Digitized by the Internet Archive
in 2025

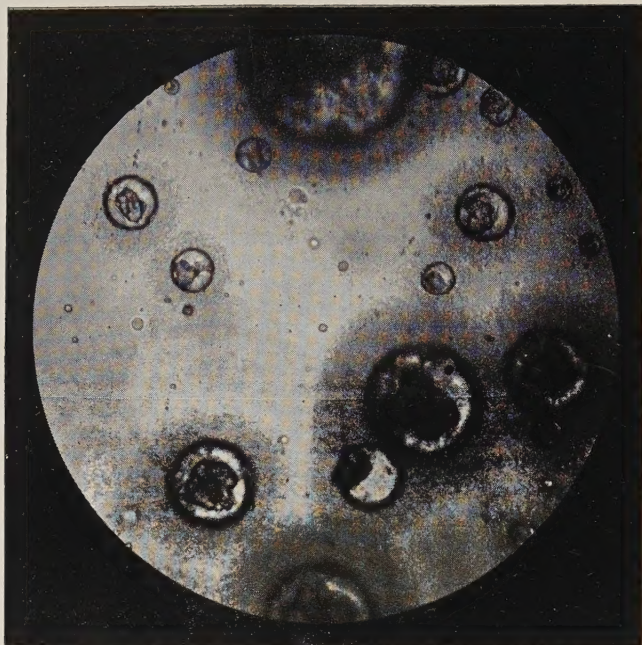


Fig 1.

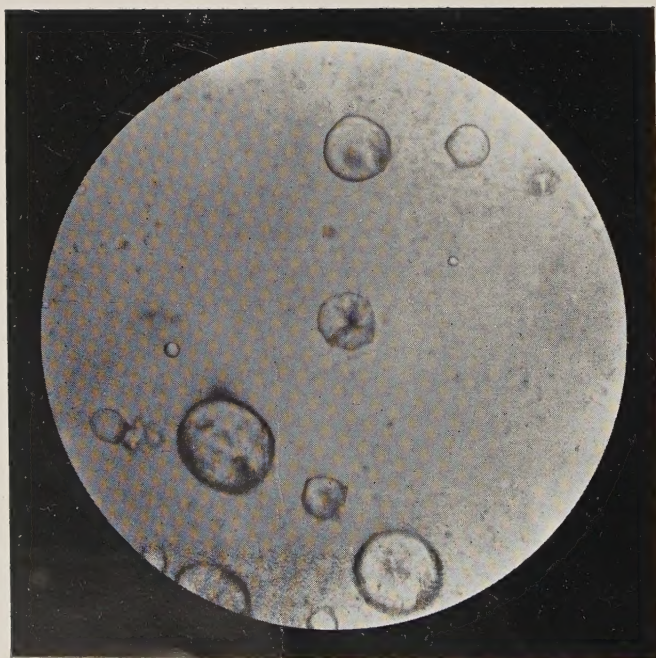


Fig 2.

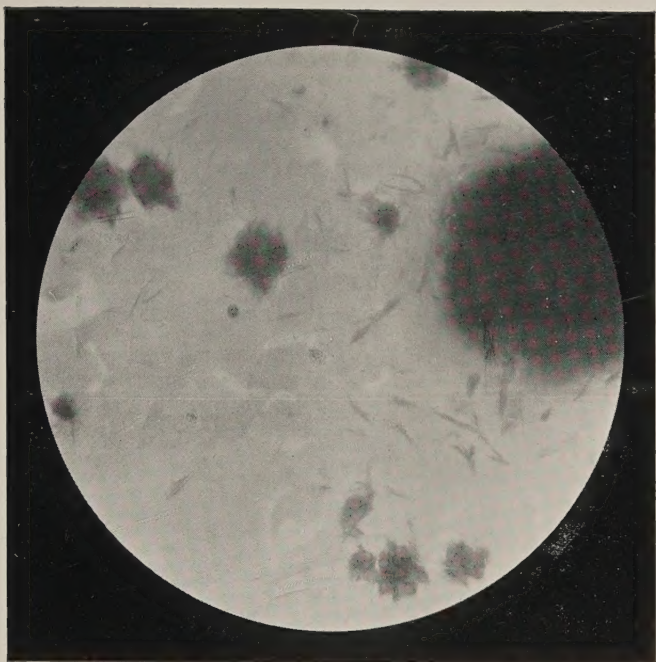


Fig 3.

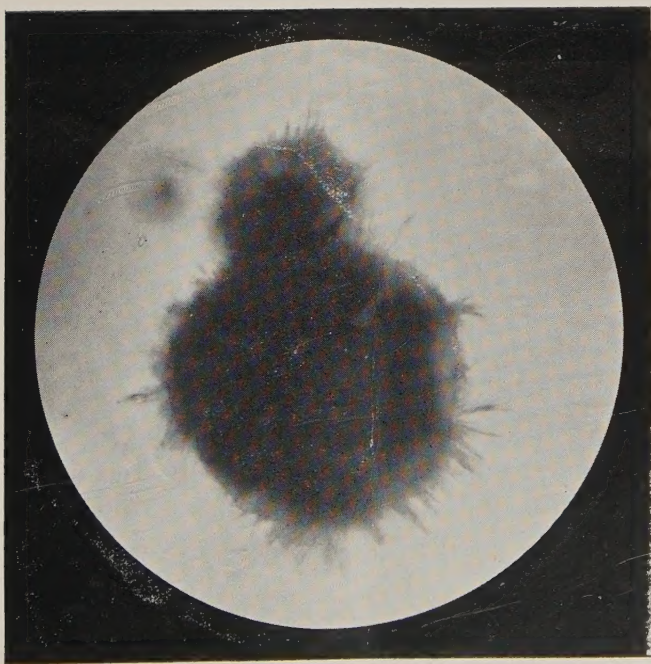


Fig 4.

Les Bactéries hydrolysant et oxydant les graisses.

par

E. DE KRUYFF.

Bactériologue.

§ 1. Introduction.

On ne sait jusqu'ici que très peu de choses au sujet des transformations que les graisses subissent dans le sol, avant de rentrer dans le mouvement circulaire de la nature à l'état d'acide carbonique et d'eau. Les recherches, entre autres, de Rübner (Rübner: Ueber Spaltung und Zersetzung von Fetten und Fettsäuren in Boden und Nährflüssigkeiten. Archiv für Hygiene, Band 38, pag. 67) ont démontré que, dans le sol, les graisses sont tout d'abord hydrolysées en glycérine et acide gras libre, puis, que chacun de ces composants est oxydé en acide carbonique et eau, cette hydratation et cette oxydation étant dues à l'action de micro-organismes; mais ces microbes eux-mêmes et leur action sur les divers composants des graisses sont encore presque inconnus.

L'insuffisance de nos connaissances d'un groupe de micro-organismes qui jouent pourtant un rôle si important dans la nature a surtout pour cause qu'une méthode facile et sûre pour démontrer l'action de ces microbes sur les graisses manquait jusqu'ici. Il en résultait que l'isolement de ces organismes donnait beaucoup de difficultés. En outre, l'oxydation des graisses dans les milieux de culture liquides ne se fait, à cause de la

chaleur de combustion si élevée des acides gras, que très lentement. Cette chaleur est par exemple pour l'acide stéarique 9429 Calories, pour l'acide oléique 9495 Calories, tandis que pour le glucose par exemple elle n'atteint que 3692 Calories.

Le but des recherches suivantes sur ces micro-organismes était en premier lieu de tâcher de trouver une méthode pour démontrer leur action hydrolysante et oxydante sur les plaques de gélose, ensuite de trouver une méthode pour la culture élective, enfin d'étudier la manière dont se fait cette oxydation des acides gras de poids moléculaire élevé.

A ces bactéries oxydant et hydrolysant les graisses, je propose de donner le nom de LIPOBACTER.

§ 2. Constitution des plaques de gélose servant à démontrer l'action hydrolysante et oxydante des Lipobacter.

Les deux méthodes données dans la littérature pour démontrer l'action des LIPOBACTER sur les graisses : celle de EYKMAN (Centralblatt für Bacteriologie 1, 1901 pag. 841) et celle de RAHN (Centralblatt für Bacteriologie 2. Band. 15, pag. 422.) se basent sur l'action *oxydante* des Lipobacter et non sur leur action *hydrolysante*. Et, comme nous l'avons vu dans l'introduction, cette oxydation des acides gras ne se fait, à cause de leur chaleur calorique élevée, que très lentement, et c'est ainsi qu'il faut beaucoup de temps pour l'oxydation d'une petite quantité d'une graisse quelconque. L'oxydation totale des petites gouttelettes de graisse suspendues dans la plaque de gélose est si lente que, dans les cultures vieilles [seulement, on peut constater l'éclaircissement de la plaque et cet éclaircissement n'a lieu que quand les bactéries croissent suffisamment vite. Pour démontrer l'action hydrolysante de la lipase, il

est nécessaire d'ajouter au gélose nutritif un glycéride dont les deux composants sont solubles dans l'eau. Je choississais comme glycéride la butyrine, glycéride de l'acide butyrique normal, huile de la composition $C_3H_5(C_4H_7O_2)_3$ et j'en ajoutais 0,5‰ au gélose nutritif fondu, que j'agitais fortement avant d'en faire des plaques. Les plaques faites de cette manière sont troublées par de petites gouttelettes d'huile. Des colonies de LIPOBACTER donnent sur ces plaques une hydratation de la butyrine en acide butyrique et en glycérine. Le champ de diffusion de la diastase autour des colonies forme un cercle transparent dans la plaque trouble. Les microbes ne sécrétant pas de la lipase ne croissent pas sur des plaques ainsi composées, ce qui est d'un grand avantage quand on veut compter les Lipobacter dans un matériel quelconque. L'acide butyrique diffuse dans la plaque entière, de sorte qu'il ne peut arriver que très rarement que la concentration d'acide devienne nuisible à la croissance des colonies. Si on craint que ce cas ne se présente, on peut remplacer la butyrine par le glycéride de l'acide oléique, la trioléine, huile qui peut aussi servir pour démontrer l'action des LIPOBACTER sur les graisses. Si, aux plaques préparées avec la trioléine, on ajoute du nitrate de potassium comme source d'azote, on verra que le champ de diffusion de la lipase autour des colonies de Lipobacter est très nettement indiqué, non par l'éclaircissement de la plaque (ce qui n'arrive que plus tard), mais par un cercle blanc, bordant le champ de diffusion et qui, comme l'examen microscopique le montre, est formé de petits aiguilles de cristaux très fins. Ceci n'a pas lieu avec les plaques de butyrine. Ces cristaux ne se forment pas autour de toutes les colonies de Lipobacter, mais seulement avec celles dont *les bactéries peuvent réduire le nitrate en nitrite*. Les Lipobacter qui

ne possèdent pas cette propriété se font reconnaître sur ces plaques par les gouttelettes de trioléine, qui, sous les colonies, apparaissent tout-à-fait blanches, couleur due à la croissance de bactéries dans l'intérieur des gouttelettes. Toutes les huiles grasses, aussi bien que l'acide oléique lui-même, donnent ce phénomène.

La composition des plaques de gélose est la suivante :

Butyrine ou trioléine	0,5%
Nitrate de potassium	0,1%
Diphosphate de potassium	0,05%
Sels inorganiques	traces
Gélose	1,5-2%

La figure 2 de la planche 1 reproduit une plaque de gélose acide oléique-nitrate de potassiumensemencée avec *B. fluorescens liquefaciens* à un grossissement de 180. Les gouttelettes d'acide oléique sont entièrement remplies de cristaux. La culture était ensemencée depuis 3 jours. La figure 3 de la planche 2 reproduit une culture du même microbe sur une plaque avec de la trioléine au lieu d'acide oléique, à un grossissement de 250. On voit ici les cristaux se trouver aussi dans l'espace qui sépare les gouttelettes. La figure 4 de la même planche nous montre une des gouttelettes de la figure 2 grossie 400 fois. La figure 1 planche 1 et la figure 3 planche 2 sont des cultures de *B. fluorescens liquefaciens* sous des conditions tout-à-fait semblables, sauf que la première contient comme source d'azote le chlorure d'ammonium et la seconde le nitrate de potassium. Autour de chaque gouttelette d'huile, dans la figure 1, s'est formée une petite colonie.

Selon toute probabilité, ces cristaux sont des produits de polymérisation de l'acide oléique en acide élaïdique sous l'influence du nitrite: ils ne se forment jamais qu'avec l'acide oléique ou la trioléine et seulement en

présence du nitrite. Dans les cultures vieilles, ces cristaux sont absorbés par les microbes et le champ de diffusion de la diastase s'éclaircit. Les mêmes aiguilles se forment aussi dans les milieux de culture liquides sous des conditions analogues; la quantité en est toujours si minime, qu'il était impossible de récolter assez de matériel pour déterminer quelques constantes physiques ou chimiques.

Les bactéries du groupe des LIPOBACTER sont très répandues dans la nature: il a été possible de les isoler de sols de diverses provenance, de l'eau de rivière, de l'eau d'égout, de vieux beurre, d'excréments de divers animaux. Mais s'ils sont très fréquents, ils sont, dans ces différents milieux, en quantité si faible, que l'ensemencement direct sur des plaques de gélose-butyrine ne donne, dans la plupart des cas, que des résultats très insuffisants et pour les isoler il était nécessaire d'employer la culture élective.

§ 3 Méthodes pour la culture élective des LIPOBACTER.

Pour la culture élective de ces organismes, je faisais des liquides nutritifs qui, en dehors de la source d'azote et des sels inorganiques nécessaires, ne contenaient qu'un des glycérides des acides gras. Comme ces organismes, vu la constitution des acides gras de poids moléculaire élevé, doivent être très aérobés, je les cultivais en couche mince dans un Erlenmeyer et en renouvelant souvent l'air dans les flacons. Le glycéride, en poudre très fine, n'était ajouté qu'après la stérilisation. La température de culture était toujours 37°. Comme source d'azote j'employais le nitrate de potassium, l chlorure d'ammonium ou la peptone. Comme glycérides j'ajoutais un des suivants: la butyrine, la tripalmitine, la tristéarine la trioléine ou l'élaïdine. La composition des milieux de cultures liquides était:

Glycéride	0,3-0,5	Grammes
Source d'azote	0,1	„
Diphosphate de potassium	0,05	„
Sels inorgan.	traces	
Eau distillée	100	„

Pour les cultures électives, je mettais 20 c.c. dans un Erlenmeyer et ensuite j'enseménçais avec un peu de matériel et je cultivais à 37°. Après deux ou trois jours, le liquide se troublait fortement et bientôt les petites particules de glycéride étaient couvertes d'une couche de mucilage. A ce stade, je réenseménçais dans un liquide de la même composition. Si, à partir de ces secondes cultures, j'inoculais de la gélose de viande contenant un peu de butyrine, je pouvais constater que le liquide ne contenait que des bactéries oxydant et hydratant les graisses.

Des cultures électives, faites de la même manière, mais avec de l'acide gras libre au lieu du glycéride, réussissent assez bien. Ici aussi on obtient après un seul réensemencement des cultures qui ne contiennent que des LIPOBACTER. Cette faculté de pouvoir oxyder les acides gras libres de poids moléculaire élevé n'appartient qu'aux bactéries du groupe des Lipobacter: pas une seule des bactéries ordinaires du sol n'ont ce pouvoir de consommer comme source de carbone ces acides gras insolubles dans l'eau. Ces deux facultés: HYDROLYSE DES GLYCERIDES et OXYDATION DES ACIDES INSOLUBLES existent toujours simultanément; je n'ai pas trouvé de bactéries possédant une seule de ces propriétés à l'exclusion de l'autre.

Pour isoler des LIPOBACTER formant des spores j'ai fait des cultures à température élevée (41°) que j'infectais avec du sol pasteurisé, mais sans succès.

Quoique l'oxydation des acides gras de poids molé-

culaire élevé, sous des conditions anaérobies, soit impossible, on pouvait supposer cependant qu'il existerait des microbes anaérobies pouvant hydrolyser les glycérides et n'employer parmi les produits de cette hydratation que la glycérine. Des essais pour isoler ces anaérobies n'ont pas eu de succès.

§ 4. L'hydrolyse et l'oxydation des graisses.

L'hydrolyse des glycérides des acides gras a lieu sous l'influence d'une diastase sécrétée par les bactéries. Cette diastase, la lipase, est un ferment soluble dans l'eau et peut diffuser dans la gélose. La présence de petites quantités d'acide ou d'alcali dans les milieux de culture n'a pas la moindre influence, ni sur la sécrétion, ni sur l'action de la lipase. La sécrétion de lipase est en relation avec la nutrition. En ajoutant aux milieux de culture une source de carbone facilement assimilable, comme par exemple le glucose ou la glycérine, il est possible de diminuer ou quelquefois aussi de supprimer tout-à-fait la sécrétion de la diastase. Tandis qu'avec les bactéries à amylase (E. DE KRUYFF. Les bactéries à amylase, Bulletin No. 3) l'addition de peptone empêche quelquefois la sécrétion du ferment, chez les LIPOBACTER au contraire la sécrétion de la lipase a toujours lieu en présence de la peptone. La quantité de lipase sécrétée sous des conditions analogues par les divers LIPOBACTER peut différer beaucoup, comme le montre le tableau suivant. Elle est en rapport avec la quantité d'acide libre formé des glycérides.

Comme on le voit par ces chiffres, le LIPOBACTER 6 sécrète beaucoup de diastase : presque tout le mélange se compose d'acide libre. Chez le *B. fluorescens liquefaciens* au contraire la sécrétion de lipase n'est pas si abondante : dans le mélange il ne se trouve qu'une petite quantité d'acide libre.

Tableau I.

Constitution du milieu de culture	Ensemencé avec	Quantité du glycéride ajoutée	Quantité de glycéride et d'acide gras trouvée après 12 jours de culture.	Acide libre dans ce mélange.
Trioléine NH_4Cl	Lipobacter 6	0,258 Gr.	0,155 Gr.	0,150 Gr.
Tripalmitine NH_4Cl	Lipobacter 6	0,241 Gr.	0,133 Gr.	0,127 Gr.
Tristéarine NH_4Cl .	B. fluor. liquef.	0,144 Gr.	0,060 Gr.	0,019 Gr.
Trioléine NH_4Cl	B. fluor. liquef.	0,223 Gr.	0,133 Gr.	0,011 Gr.

Oxydée en
12 Jours.

— ∞ —

Butyrine NH_4Cl	Lipobacter 6	0,352 Gr.	0,053 Gr.	0,299 Gr.
Tripalmitine NH_4Cl	"	0,248 Gr.	0,146 Gr.	0,102 Gr.
Tristéarine NH_4Cl	"	0,181 Gr.	0,090 Gr.	0,091 Gr.
Trioléine NH_4Cl	"	0,258 Gr.	0,158 Gr.	0,100 Gr.
Graisse de Palaequium NH_4Cl	"	0,292 Gr.	0,194 Gr.	0,098 Gr.
Acide stéarique	"	0,321 Gr.	0,239 Gr.	0,082 Gr.
Tristéarine	B. fluor. liquef.	0,144 Gr.	0,060 Gr.	0,084 Gr.
Acide palmitique	"	0,244 Gr.	0,155 Gr.	0,089 Gr.
Acide oléique	"	0,181 Gr.	0,079 Gr.	0,102 Gr.
Acide stéarique	"	0,278 Gr.	0,200 Gr.	0,078 Gr.
Tristéarine	Lipobacter 7	0,196 Gr.	0,140 Gr.	0,056 Gr.
Acide palmitique	"	0,289 Gr.	0,218 Gr.	0,071 Gr.

Tableau II.

On pourrait croire à une préférence des LIPOBACTER pour certains glycérides selon leur constitution, par exemple selon le nombre des atomes de carbone, ou selon la présence d'une double liaison, comme il s'en trouve chez l'acide oléique; mais, comme le montre le tableau 2, il n'est pas question de semblables préférences. Seule la quantité de butyrine oxydée est bien plus élevée que celle des autres glycérides. La raison de cette exception est bien claire: d'abord les deux produits de l'hydrolyse sont solubles dans l'eau et ensuite l'effet calorique de l'acide butyrique est bien moins élevé que celui des autres acides comme par exemple l'acide stéarique (5647 Cal. et 9429 Cal.)

Le cire d'abeille se montrait aussi assimilable par les LIPOBACTER mais bien moins que les graisses. (0,040 Gr. par le LIPOBACTER 6 en 12 jours.)

De quelle manière se fait cette oxydation des acides gras par les LIPOBACTER?

Elle peut se faire par deux procédés: ou bien graduellement en formant des produits intermédiaires, ou bien directement jusqu'à l'acide carbonique et l'eau.

Pour résoudre cette question je faisais des cultures liquides dans des Erlenmeyers de 1 Litre contenant 200 c.c. de liquide de culture. Pour être indépendant des produits de l'oxydation de la glycérine, j'employais pour ces expériences non pas les glycérides, mais les acides gras libres. La proportion de ces acides restant dans les liquides de culture fut analysée de 10 jours en 10 jours. J'avaisensemencé avec le LIPOBACTER 6, et comme acide gras j'ajoutais ou l'acide stéarique ou l'acide oléique. Dans aucune de ces cultures, malgré l'emploi de diverses méthodes de recherche, il n'a été possible de démontrer la présence de produits intermédiaires: il ne reste donc qu'à accepter l'idée que ces acides de poids moléculaire

élevé sont oxydés directement en acide carbonique et eau.

§ 5 Les LIPOBACTER isolés.

Comme nous l'avons vu dans le § 3 les LIPOBACTER n'ont pas de préférence pour les divers glycérides ou acides gras. Il ne faut donc pas s'étonner si les cultures électives avec des glycérides ou acides variés ne montraient que des différences insignifiantes. Je n'ai pas isolé des LIPOBACTER formant des spores.

Description des LIPOBACTER isolés.

LIPOBACTER No. 1.

Isolé de sol du Jardin botanique.

Forme sur la gélose de viande des colonies blanches, visqueuses, qui possèdent un centre nettement délimité. Sur la gélatine de viande, ce centre est gonflé. Ne sécrète pas de trypsine. Cette bactérie fermente le mannite, le glucose, le saccharose et le maltose et transforme le nitrate en nitrite. Elle dédouble l'indican et sécrète de la lipase.

Bâtonnets immobiles, ne formant pas de spores, longs de $1,2-1,5\mu$.

LIPOBACTER No. 2.

Isolé d'eau d'égout.

Forme sur la gélose de viande des colonies fluorescentes. Sur la gélatine de viande des colonies avec un bord ponctué liquifiant lentement. Ne fermente pas les sucres, ne dénitrifie pas, ne forme pas de nitrite. Sécrète de la lipase.

Bâtonnets mobiles longs de $2,4\mu$ et larges de $0,6\mu$. Ne forme pas de spores.

LIPOBACTER No. 3.

Isolé du sol.

Sur la gélose de viande, il forme des colonies blanches un peu fluorescentes. Sur la gélatine de viande, des

colonies transparentes avec un centre de forme irrégulière. Ne sécrète pas de trypsine et ne dénitrifie pas. Sécrète de la lipase et ne fermente pas les sucres.

Bâtonnets mobiles, longs de $1,6\mu$, ne formant pas de spores.

LIPOBACTER No. 4.

Isolé de sol et d'eau de rivière.

Sur la gélose de viande cette bactérie forme des colonies épaisses qui, en vieillissant, se colorent en jaune. Sur la gélatine de viande les colonies sont jaunes et ne liquéfient pas. Ne fermente pas les sucres et ne dénitrifie pas. Ne forme pas de nitrite. Sécrète de la lipase.

Diplocoques larges de $1,3\mu$.

LIPOBACTER No. 5.

Isolé du sol.

Sur la gélose de viande, il forme des colonies visqueuses, couleur chair et sur la gélatine des colonies transparentes qui ne liquéfient pas. Ne fermente pas les sucres et forme du nitrite. Sécrète de la lipase.

Bâtonnets long de $1,5\mu$, immobiles, ne formant pas des spores.

LIPOBACTER No. 6.

Isolé de sol, de l'eau, etc. Très répandu dans la nature.

Forme sur la gélose de viande des colonies transparentes de forme irrégulière, liquéfie la gélatine. Ne fermente pas les sucres et ne forme pas de nitrite. Dédouble l'indican. Sécrète de la lipase.

Bâtonnets mobiles longs de $0,8\mu$.

LIPOBACTER No. 7.

Isolé du sol et d'eau d'égout.

Sur la gélose de viande forme des colonies fluorescentes ponctuées. Sur la gélatine de viande des colonies transparentes, fluorescentes et liquéfiantes. Fermente le

mannite, le glucose, le saccharose, et le maltose. Dédouble l'indican et forme du nitrite. Sécrète de la lipase.

Bâtonnets mobiles longs de $2,0\mu$ et larges de $0,4\mu$. Ne formant pas de spores. Dans le bouillon la bactérie forme des chaînes courtes.

LIPOBACTER No. 8.

Isolé du sol.

Les colonies sur la gélose de viande sont blanches et un peu viqueuses. Sur la gélatine de viande elles sont transparentes comme des gouttes d'eau et ne liquéfient pas. Fermente le mannite le glucose, le saccharose, le maltose. Forme du nitrite et ne dénitrifie pas. Sécrète de la lipase.

Bâtonnets immobiles, longs de $2,0\mu$ et large de $0,6\mu$. Ne forme pas de spores.

LIPOBACTER No. 9. = *Bacterium fluorescens liquefaciens*.

BUITENZORG, Février 1907

Tableau III.

Resumé de l'action décomposante des graisses sous
l'influence des LIPOBACTER isolés

Constitution du milieu de culture:	Ensemencé avec:	Quantité de graisse ajoutée:	Quantité de graisse trouvée après 12 jours de culture:	Quantité de graisse oxydée en 12 jours.
Tristéarine NH_4Cl	Lipobacter 1	0,150 Gr.	0,100 Gr.	0,050 Gr.
"	Lipobacter 2	0,204 Gr.	0,132 Gr.	0,072 Gr.
"	Lipobacter 3	0,234 Gr.	0,203 Gr.	0,031 Gr.
"	Lipobacter 4	0,143 Gr.	0,104 Gr.	0,039 Gr.
"	Lipobacter 5	0,159 Gr.	0,108 Gr.	0,051 Gr.
"	Lipobacter 6	0,181 Gr.	0,090 Gr.	0,091 Gr.
"	Lipobacter 7	0,196 Gr.	0,103 Gr.	0,093 Gr.
"	Lipobacter 8	0,187 Gr.	0,120 Gr.	0,067 Gr.
"	B. fluor. liquef.	0,144 Gr.	0,060 Gr.	0,084 Gr.

